

PLANT CELL HAVING ANIMAL SACCHARIDE CHAIN ADDING FUNCTION

Publication number: JP2001333787 (A)

Publication date: 2001-12-04

Inventor(s): TANIGUCHI NAOYUKI; SEKI TATSUJI; FUJIYAMA KAZUHITO +

Applicant(s): TANIGUCHI NAOYUKI; SEKI TATSUJI; FUJIYAMA KAZUHITO +

Classification:

- **international:** *A01H5/00; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12P19/00; C12P21/02; A01H5/00; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12P19/00; C12P21/02; (IPC1-7): A01H5/00; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12P19/00; C12P21/02*

- **European:**

Application number: JP20010062704 20010306

Priority number(s): JP20010062704 20010306; JP20000081059 20000322

Abstract of JP 2001333787 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a plant cell having an animal saccharide chain. **SOLUTION:** This plant cell has an animal saccharide chain adding function and comprises a gene capable of encoding an enzyme capable of transferring a fucose residue to a reducing terminal acetylglucosamine residue of a saccharide chain contained in a glycoprotein and derived from an animal and transduced thereto.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-333787

(P2001-333787A)

(43) 公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	特許出願公開番号
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 9/10	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 19/00	
9/10		21/02	C
C 1 2 P 19/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 38 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-62704 (P2001-62704)	(71) 出願人	592196101 谷口 直之 大阪府豊中市上野東 2-19-32-201
(22) 出願日	平成13年 3 月 6 日 (2001.3.6)	(71) 出願人	598169686 岡 達治 大阪府箕面市箕面 5-13-53-209
(31) 優先権主張番号	特願2000-81059 (P2000-81059)	(71) 出願人	598169697 藤山 和仁 大阪府吹田市山田西 1-28 A18-308
(32) 優先日	平成12年 3 月 22 日 (2000.3.22)	(72) 発明者	谷口 直之 大阪府豊中市上野東 2-19-32-201
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞

(57) 【要約】

【課題】 動物型の糖鎖を有する植物細胞を提供する。

【解決手段】 動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞であって、糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子が導入された、植物細胞。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞であって、

糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子が導入された、植物細胞。

【請求項2】 前記動物由来の酵素が、 α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項1に記載の植物細胞。

【請求項3】 請求項1または2に記載の植物細胞から再生された植物体。

【請求項4】 動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞の生産方法であって、

植物細胞に、糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基へのフコース残基の転移反応を行い得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子を導入する工程を包含する、方法。

【請求項5】 動物型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法であって、

植物細胞に、糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子および異種糖タンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換植物細胞を得る工程、および得られた形質転換植物細胞を培養する工程、を包含する、方法。

【請求項6】 動物型糖鎖を持つ糖タンパク質の生産方法であって、

還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る酵素の遺伝子および異種糖タンパク質の遺伝子を導入して形質転換された植物細胞を得る工程、および該酵素を細胞内小器官で発現させる工程、を包含する、方法。

【請求項7】 請求項6に記載の方法によって得られた動物型糖鎖をもつ糖タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞、該植物細胞から再生された植物体、該植物細胞を生産する方法、該植物細胞を用いて動物型糖タンパク質を生産する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】植物細胞を、従来の古典的な育種法により改良するのではなく、遺伝子操作技術により植物細胞を改良し、さらに、新たな形質または有用形質をも付与することが可能となった。例えば、これまでに、耐病性、除草剤耐性、日持ちなどが改良された植物体が創製され、そして利用されている。また、従来、動物細胞、酵母、大腸菌などの微生物を用いて生産されてきた有用タンパク質が、植物細胞または植物体で生産できるようになってきた。

【0003】現在までに、植物細胞または植物体における単純タンパク質または糖タンパク質を発現した例として以下の報告がある。

【0004】 α -1-アンチトリプシンについて、Appl Microbiol Biotechnol 1999 Oct;52(4):516-23 Terasima M, Murai S, Kawamura M, Nakanishi S, Stoltz T, Chen L, Drohan W, Rodriguez RL, Katoh S; α -アミラーゼについて、Biotechnology (N Y) 1992 Mar;10(3):292-6 Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, van Ooyen AJ, van den Elzen PJ, Rietveld K, Hoekema A;ヘモグロビンについて、Nature 1997 Mar 6;386(6620):29-30 Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden MC, Gruber V, Bournat P, Baudino S, Merot B;キシナーゼについて、Nat Biotechnol 1999 May;17(5):466-9 Production of recombinant proteins in plant root exudates. Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I;抗体について、Eur J Biochem 1999 Jun;262(3):810-6 Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, Schillberg S, J Immunol Methods 1999 Jun 24;226(1-2):1-10 Fischer R, Liao YC, Drossard J, Curr Top Microbiol Immunol 1999 9;236:275-92 Ma JK, Vine ND, J Immunol Methods 1998 Nov 1;220(1-2):69-75 Verch T, Yusibov V, Koprowski H;フィクゼについて、Biochem Biophys Res Commun 1999 Oct 14;264(1):201-6 Characterization of recombinant fungal phytase (phyA) expressed in tobacco leaves. Ullah AH, Sethumadhavan K, Mullane EJ, Zieglerhoffer T, Austin-Phillips S, Plant Physiol 1997 Jul;114(3):1103-11 Secretion of active

- recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. Li J, Hegeman C E, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow MD, Grabau EA; ヒト血清アルブミンについて, Biotechnology (NY) 1990 Mar; 8(3): 217-21 Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A; ヒトラクトアルブミンについて, J Biochem (Tokyo) 1998 Mar; 123(3): 440-4 Expression of human alpha-lactalbumin in transgenic tobacco. Takase K, Hagiwara K; ヒトインターフェロンについて, J Interferon Res 1992 Dec; 12(6): 449-53 Edelbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Seligman I; ヒトドウロニナーゼについて, Curr Top Microbiol Immunol 1999; 240: 95-118 Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK; GM-CSFについて, CMAJ 1995 Aug 15; 153(4): 427-9 Robinson A; ヒルジンについて, Plant Mol Biol 1995 Dec; 29(6): 1167-80 Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. Parmenter DL, Boothe JG, van Rooijen GJ, Yeung EC, Moloney MM; ヒトラクトフェリンについて, Protein Expr Purif 1998 Jun; 13(1): 127-35 Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. Salmon V, Legrand D, Slomianky MC, el Yazidi I, Spik G, Gruber V, Bournaud P, Ollagnier B, Mison D, Thiesen M, Merot B Plant Physiol 1994 Nov; 106(3): 977-81 Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). Mitra A, Zhang Z; アンジオテンシン転移酵素阻害ペプチドについて (トマトおよびタバコ), Biotechnology (N Y) 1993 Aug; 11(8): 930-2 Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagawa N, Hashida E, Matsunaga Y, Takemoto S, Watanabe Y, Okada Y; ポリヒドロキシブチレンについて, Nat Biotechnol 1999 Oct; 17(10): 1011-6 Metabolic engineering of Arabidopsis and Brassica for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, Haro M, Reiser SE, Taylor NB, Tran M, Valentin HE, Rodriguez DJ, Stone DA, Padgett S R, Kishore G, Gruys KJ Planta 1999 Oct; 209(4): 547-50 Poly(beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of brassica napus. Houmiel KL, Slater S, Broyles D, Casagrande L, Colburn S, Gonzalez K, Mitsky TA, Reiser SE, Shah D, Taylor NB, Tran M, Valentin HE, Gruys KJ; グルコセレブロシダーゼについて, Ann N Y Acad Sci 1996 May; 792: 62-71 Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN Curr Top Microbiol Immunol 1999; 240: 95-118 Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK; グルコニダーゼについて, Adv Exp Med Biol 1999; 464: 127-47 Molecular farming of industrial proteins from

transgenic maize. Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z, Howard JA Biotechnol Bioeng 1998 Oct 5; 60(1):44-52. Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant beta-glucuronidase. Kusnadi AR, Evangelista RL, Hood EE, Howard JA, Nikolov ZL; エリスロポエチンについて. Plant Mol Biol 1995 Mar; 27(6):1163-72. Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R Biosci Biotechnol Biochem 1993 Aug; 57(8):1249-52. Matsumoto S, Ishii A, Ikura K, Ueda M, Sasaki R glutamic acid decarboxylase Nat Med 1997 Jul; 3(7):793-6. Ma SW, Zhao D L, Yin ZQ, Mukherjee R, Singh B, Qin HY, Stiller CR, Jenikar AM Adv Exp Med Biol 1999; 464:179-94. Ma S, Jevnikar AM, など。

【0005】有用タンパク質の生産のために、植物細胞または植物体を宿主として用いる利点は、それがタンパク質に糖鎖を付加する機能を有することである。

【0006】遺伝子組換えタンパク質生産に一般的に用いられている大腸菌には糖鎖付加機能はない。酵母は糖鎖付加機能を有するが、動物とは異なる構造の糖鎖を付加する。また動物においても、その種によって異なる構造の糖鎖が付加される。さらに、動物の同一個体においてさえ、組織により、また発生および分化の段階などに依りて、付加される糖鎖構造が大きく変わることが知られている。

【0007】一般に、糖タンパク質の糖鎖構造は、その結合様式により2種類に分類される。1つは、タンパク質のアスパラギン残基に結合するN-結合型糖鎖であって、他方は、タンパク質のセリンあるいはスレオニンに結合するO-結合型糖鎖である。このうちN-結合型糖鎖について注目すると、動物、植物、昆虫、酵母などでは高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖、およびそのハイブリッド型糖鎖が存在する。

【0008】糖タンパク質糖鎖はコア構造(コア糖鎖)を有している。コア糖鎖は、細胞の小胞体において、まず脂質との複合体の形態で合成され、タンパク質に転移する(Annu Rev Biochem 1985; 54:631-64 Kornfeld R, Kornfeld S)。そして、転移したコア糖鎖を有する

タンパク質は、小胞体からゴルジ体に輸送され、そこで、コア糖鎖にさらに糖が付加されて糖鎖が伸長していく。ゴルジ体におけるこの糖鎖の伸長は、末端部糖鎖合成と呼ばれ、生物種に依りて大きく異なることが知られている。

【0009】さらに、コア糖鎖内の還元末端部位に存在するN-アセチルグルコサミン残基に付加するフコース残基の結合様式も生物種により異なることから知られている(Biochim Biophys Acta 1999 Dec 6; 1473(1):216-36 Staudacher E, Altmann F, Wilson IB, Marz L)。

【0010】上記のように、植物は、動物と同様に糖鎖付加機構を有しているため、有用糖タンパク質の生産宿主として使用される可能性を持っている。しかし、生産しようとするタンパク質が生理活性タンパク質である場合、これらタンパク質の翻訳後修飾、特に糖鎖付加が皆尾良く行われなければ、生理活性タンパク質本来の活性を示さないタンパク質もある。また、植物には、動物、特にヒトの糖鎖付加機構と異なる機構も存在するため、本来の糖タンパク質とは異なる構造の糖鎖が付加され、得られた糖タンパク質がヒトに対して抗原性を示す可能性が指摘されている(Glycobiology 1999 Apr; 9(4):365-72 Cabanes -Macheteau M, Fitchette-Laine AC, Loutelier-Bourhis C, Lange C, VincND, Ma JK, Le rouge P, Faye L)。

【0011】植物糖鎖の特徴的な構造は、コア糖鎖内の還元末端部位に存在するN-アセチルグルコサミン残基に付加するフコース残基の結合様式である。フコース残基の結合様式は、これまで、生物種により異なることが報告されている(Biochim Biophys Acta 1999 Dec 6; 1473(1):216-36 Staudacher E, Altmann F, Wilson IB, Marz L)。植物では α 1,3-結合が(Biosci Biotechnol Biochem 1999 Jan; 63(1):35-9 Palacpac NQ, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T; Biosci Biotechnol Biochem 1997 Nov; 61(11):1866-71 Kimura Y, Ohno A, Takagi S; Eur J Biochem 1991 Jul 1; 199(1):169-79 Sturm A)、ヒトやマウスなどの哺乳類では α 1,6-結合が(Glycobiology 1991 Sep; 1(4):337-46 Takeuchi M, Kobata A)それぞれ報告されている。図9に、植物と動物の複合型糖鎖構造を示す。昆虫細胞では α 1,3-

結合と $\alpha 1, 6$ -結合の両方が見出されている (Glycoconj J 1998 Nov;15(11):1055-70 Wilson IB, Altmann F; Eur J Biochem 1991 Aug 1;199(3):745-51 Staudacher E, Altmann F, Glossl J, Marz L, Schachter H, Kamerling JP, Hard K, Vliegenthart JF).

【0012】植物や昆虫に由来する糖タンパク質の $\alpha 1, 3$ -結合を含む糖鎖部分は、ヒトに対する抗原性を示す可能性がある (Glycoconj J 1998 Nov;15(11):1055-70 Wilson IB, Altmann F; Int Arch Allergy Immunol 1999 Feb-Apr;118(2-4):411-3 Peterse N A, Grobe K, Schramm G, Vieths S, Altmann F, Schlaak M, Becker WM; Int Arch Allergy Immunol 1999 Sep;120(1):30-42 Fotisch K, Altmann F, Hausteiner D, Vieths S).

【0013】N-アセチルグルコサミン残基にフコース残基を付加する酵素の遺伝子として、植物では、ヤエナリ (mung bean) から $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ cDNA がクローニングされている (J Biol Chem 1999 Jul 30;274(31):21830-9 Leiter H, Mucha J, Staudacher E, Grimm R, Glossl J, Altmann F). 哺乳類では、ヒトおよびブタから $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ cDNA がクローニングされている (J Biochem (Tokyo) 1997 Mar;121(3):626-32 Yanagidani S, Uozumi N, Ihara Y, Miyoshi E, Yamaguchi N, Taniguchi N; J Biol Chem 1996 Nov 1;271(44):27810-7 Uozumi N, Yanagidani S, Miyoshi E, Ihara Y, Sakuma T, Gao CX, Teshima T, Fujii S, Shiba T, Taniguchi N).

【0014】シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I 遺伝子の変異株が取得された。この変異株では、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I 以降の糖鎖プロセッシングが停止していた (Plant Physiol 1993 Aug;102(4):1109-18 von Schaewen A, Sturm

A, O'Neill J, Chrispeels M J). この変異株にヒト由来のN-アセチルグルコサミン転移酵素 I cDNA を導入すると、N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が回復した (Proc Natl Acad Sci USA 1994 Mar 1;91(5):1829-33 Gomez L, Chrispeels MJ). これは逆に、*Arabidopsis thaliana* 由来のN-アセチルグルコサミン転移酵素 I cDNA をN-アセチルグルコサミン転移酵素活性のないCHO細胞変異株 Lec1 に導入すると、CHO細胞のN-アセチルグルコサミン転移酵素活性を回復できた (Biochem Biophys Res Commun 1999 Aug 11;261(3):829-32 Bakker H, Lommen A, Jordi W, Stiekema W, Bosch D).

【0015】さらに、窒素固定菌 *Rhizobium* sp. NGR234 の nodZ ファクター生合成に関わる遺伝子のうち、nodZ 遺伝子がフコース転移酵素をコードすることが示された (J Bacteriol 1997 Aug;179(16):5087-93 Quesada-Vincens D, Fellay R, Nasim T, Viprey V, Burger U, Prome JC, Broughton WJ, Jabbouri S).

【0016】また、Olsthoorn らは、*Mesorhizobium loti* NZP2213 では、 $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼが、nodZ ファクター生合成に関与することを示した (Biochemistry 1998 Jun 23;37(25):9024-32 Olsthoorn MMA, Lopez-Lara IM, Petersen BO, Bock K, Haverkamp J, Spaink HP, Thomas-Oates JE). *Mesorhizobium loti* 由来の nodZ タンパク質は、GDP- β -フコースのフコース残基を、キチンオリゴ糖の還元末端 N-アセチルグルコサミン残基の C6 位に転移する (Proc Natl Acad Sci USA 1997 Apr 29;94(9):4336-41 Quinto C, Wijffjes AHM, Bloembergen GV, Blok-Tip L, Lopez-Lara IM, Lugtenberg BJ, Thomas-Oates JE, Spaink HP). この nodZ タンパク質は、動物由来 $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼと同じ酵素活性を持つが、アミノ酸配列レベルでの相同性はほとんどない (Glycobiology 1991 Dec;1(6):577-84 Macher BA, Holm EH, Swiedler SJ, Stults CL, Srnka CA; Histochem J 1

992 Nov; 24 (11): 761-70 de Vries T, van den Eijnden D H)。

【0017】さらに、 α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を持つM. loti由来NodZタンパク質を、受精したゼブラフィッシュにマイクロインジェクションすると胚発生や、胴体尻尾の奇形が生じた(Proc Natl AcadSci USA 1997 Jul 22; 94 (15): 7982-6 Bakkers J, Semino CE, Stroband H, Kijne JW, Robbins PW, Spaink HP; Ann N Y AcadSci 1998 Apr 15; 842: 49-54 Semino CE, Allende ML, Bakkers J, Spaink HP, Robbins PP)。

【0018】また、植物細胞にヒト由来 β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子cDNAをタバコ培養細胞に導入すると、植物細胞内でガラクトース残基を転移した糖鎖構造が得られ、ヒト由来糖転移酵素遺伝子を導入することで、植物細胞内糖鎖プロセス経路をリモデリングできることが示されている(Proc Natl Acad Sci USA 1999 Apr 13; 96 (8): 4692-7 Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T)。

【0019】さらに、Steinkellner は、タバコよりクロニングしたN-アセチルグルコサミン転移酵素I cDNAを用いて、アンチセンス遺伝子サブレーション法あるいは転写後ジーンサイレンス法によりN-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子発現を抑制したり、発現量を減少させることができることを示している(International Molecular Farming Conference, London, Ontario, Canada, Aug. 29 Sept. 1, 1999, Abstract Book, W79, p. 46, Steinkellner H)。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記のような生物における異なる糖鎖付加機能の存在に起因する問題を鋭意研究し、本発明を完成するに至った。本発明は、植物細胞に元来存在しなかったフコース転移酵素の遺伝子を導入することにより、上記従来の課題を解決し、動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞、該植物細胞から再生された植物体、該植物細胞を生産する方法、該植物細胞を用いて動物型糖タンパク質を生産する方法を提供することを目的とする。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明は、動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞に関し、この植物細胞は、糖タン

パク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子が導入されている。

【0022】好ましくは、上記動物由来の酵素は、 α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼである。

【0023】本発明は、1つの局面で、上記植物細胞から再生された植物体に関する。

【0024】本発明は、1つの局面で、動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞の生産方法に関し、この方法は、植物細胞に、糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基へのフコース残基の転移反応を行い得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子を導入する工程を包含する。

【0025】本発明は、1つの局面で、動物型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法に関し、この方法は、植物細胞に、糖タンパク質に含まれる糖鎖の還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る、動物由来の酵素をコードする遺伝子および異種糖タンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換植物細胞を得る工程、および得られた形質転換植物細胞を培養する工程を包含する。

【0026】本発明はまた、上記方法によって得られた動物型糖鎖をもつ糖タンパク質に関する。

【0027】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。【0028】本発明においては、他に特定されない限り、当該分野で公知である、タンパク質の分離および分析法、ならびに免疫学的手法が採用され得る。これらの手法は、市販のキット、抗体、標識物質などを使用して行い得る。より詳細には、後述の材料および方法一のセクションこれら手法を記載する。

【0029】本発明の方法は、動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞に関する。本明細書において、「動物型糖鎖」とは、コア糖鎖内の還元末端部分に存在するN-アセチルグルコサミン残基に、フコース残基が、 α 1, 6-結合により結合している糖鎖を意味する。好ましくは、上記フコース残基は、コア糖鎖の最内部にある、つまり、タンパク質のアスパラギン酸残基に結合するN-アセチルグルコサミン残基に結合する。

【0030】植物細胞は、任意の植物細胞であり得る。

植物細胞は、培養細胞、培養組織、培養器官、または植物体のいずれの形態であってもよい。好ましくは、培養細胞、培養組織、または培養器官であり、より好ましくは培養細胞である。本発明の生産方法に使用され得る植物種は、遺伝子導入を行い得る任意の植物種であり得る。本発明の生産方法に使用され得る植物種の例としては、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科の植物が挙げられる。

【0031】ナス科の植物の例としては、Nicoti

ana, Solanum, Datura, Lycopersicon, または Petunia に属する植物が挙げられ、例えば、タバコ、ナス、ジャガイモ、トマト、トウガラシ、ペチュニアなどを含む。

【0032】イネ科の植物の例としては、Oryza, Hordeum, Secale, Saccharum, Echinochloa, または Zea に属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどを含む。

【0033】アブラナ科の植物の例としては、Raphanus, Brassica, Arabidopsis, Wasabia, または Capsella に属する植物が挙げられ、例えば、大根、アブラナ、シロイヌナズナ、ワサビ、ナズナなどを含む。

【0034】バラ科の植物の例としては、Orunus, Malus, Pynus, Fragaria, または Rosa に属する植物が挙げられ、例えば、ウメ、モモ、リンゴ、ナシ、オランダイチョ、バラなどを含む。

【0035】マメ科の植物の例としては、Glycine, Vigna, Phaseolus, Pisum, Vicia, Arachis, Trifolium, Alhalfa, または Medicago に属する植物が挙げられ、例えば、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ソラマメ、ラッカセイ、クローバ、ウマゴヤシなどを含む。

【0036】ウリ科の植物の例としては、Luffa, Cucurbita, または Cucumis に属する植物が挙げられ、例えば、ヘチマ、カボチャ、キュウリ、メロンなどを含む。

【0037】シソ科の植物の例としては、Lavandula, Mentha, または Perilla に属する植物が挙げられ、例えば、ラベンダー、ハッカ、シソなどを含む。

【0038】ユリ科に属する植物の例としては、Allium, Lilium, または Tulipa に属する植物が挙げられ、例えば、ネギ、ニンニク、ユリ、チューリップなどを含む。

【0039】アカザ科の植物の例としては、Spinacia に属する植物が挙げられ、例えば、ホウレンソウを含む。

【0040】セリ科の植物の例としては、Angelica, Daucus, Cryptotaenia, または Apitum に属する植物が挙げられ、例えば、シウド、ニンジン、ミツバ、セリなどを含む。

【0041】本発明の生産方法に用いられる植物は、好ましくはタバコ、トマト、ジャガイモ、イネ、トウモロコシ、ダイコン、ダイズ、エンドウ、ウマゴヤシ、およびホウレンソウであり、より好ましくは、タバコ、トマト、ジャガイモ、トウモロコシ、およびダイズである。

【0042】「還元末端アセチルグルコサミン残基にフ

コース残基を転移し得る酵素」とは、植物細胞内の糖タンパク質のタンパク質部分の合成後、糖鎖付加の際に生じる還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る酵素である。このような酵素の例としては、 $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼが挙げられる。この酵素は、GDP-フコースを糖供与体として、糖タンパク質のN結合型糖鎖の最もペプチド鎖に近いN-アセチルグルコサミンに $\alpha 1, 6$ -結合でフコースを連結させる酵素である。この酵素は、任意の動物種に由来し得るが、哺乳動物に由来することが好ましく、ヒトに由来することがより好ましい。

【0043】好ましくは、この酵素は、細胞内小器官に局在化する酵素である。本発明者らは、特定の理論に拘束されることは意図しないが、この酵素が細胞内小器官（例えば、小胞体、ゴルジ体など）に存在することによって、植物細胞において異種タンパク質の還元末端部分に存在するN-アセチルグルコサミン残基にフコース残基が $\alpha 1, 6$ -結合により付加されるものと考えられる。

【0044】「還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る酵素の遺伝子」は、この酵素をコードすることが知られているヌクレオチド配列を用いて任意の動物細胞から単離してもよいし、市販のものを購入してもよいし、これらを植物での発現に適切ように変更して用いてもよい。このような方法は当業者に周知である。

【0045】例えば、哺乳類では、ヒトおよびブタから $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ cDNA がクローニングされ (J Biochem (Tokyo) 1997 Mar; 121 (3): 626-32 Yanagidani S, Uozumi N, Ihara Y, Miyoshi E, Yamaguchi N, Taniguchi N; 特開平10-84975, 特開平10-4959; J Biol Chem 1996 Nov 1; 271 (44): 27810-7 Uozumi N, Yanagidani S, Miyoshi E, Ihara Y, Sakuma T, Gao CX, Teshima T, Fujii S, Shibata T, Taniguchi N; 特開平10-4969, 特開平9-201191) その構造が明らかにされている。

【0046】本明細書では、「遺伝子」とは、構造遺伝子部分をいう。遺伝子は、植物での発現に適切ようにより、プロモーター、オペレーター、およびターミネーターなどの制御配列が連結され得る。

【0047】「異種糖タンパク質」とは、本発明に用いられる植物において本来発現されない糖タンパク質をいう。異種糖タンパク質の例としては、酵素、ホルモン、部位カイン、抗体、ワクチン、レセプター、血清タンパク質などが挙げられる。酵素の例としては、西洋ワサビ

ベルオキシダーゼ、キナーゼ、グルコセシロブリンダーゼ (glucocerebrosidase)、アルファガラクトシダーゼ、フィターゼ、TPA (tissue-type plasminogen activator)、HMG-CoAレダクターゼ (HMG-CoA reductase) などが挙げられる。ホルモンおよびサイトカインの例としては、エンケファリン、インターフェロン α 、GM-CSF、G-CSF、絨毛性腺刺激ホルモン、インターロイキン-2、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、エリスロポエチン、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG)、黄体形成ホルモン (LH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、プロラクチン、卵巣刺激ホルモンなどが挙げられる。抗体の例としては、IgG、scFvなどが挙げられる。ワクチンの例としては、B型肝炎表面抗原、ロタウイルス抗原、大腸菌エンテロトキシン、マラリア抗原、狂犬病ウイルスrabies virusのGタンパク質、HIVウイルス糖タンパク質 (例えば、gp120) などが挙げられる。レセプターおよびマトリックスタンパク質の例としては、EGFレセプター、フィブロネクチン、 α 1-アンチトリプシン、凝固因子VIIなどなどが挙げられる。血清タンパク質の例としては、アルブミン、補体系タンパク質、アラスミノゲン、コルチコステロイド結合グロブリン (corticosteroid-binding globulin)、スロキシシン結合グロブリン (Throxine-binding globulin)、プロテインC (protein C) などが挙げられる。

【0048】「異種糖タンパク質の遺伝子」は、目的の異種糖タンパク質をコードすることが知られているヌクレオチド配列を用いて任意の細胞から単離してもよいし、市販のものを購入してもよいし、これらを植物での発現に適切ように改変して用いてもよい。

【0049】還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る酵素および異種糖タンパク質の遺伝子は、当該分野で公知の方法により、植物細胞へ導入される。これらの遺伝子は、別々に導入してもよいし、同時に導入してもよい。植物細胞への遺伝子の導入方法の例としては、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、金粒法などが挙げられる。

【0050】遺伝子が導入された植物細胞は、当該分野で公知の方法により、導入された遺伝子の発現が確認される。このような確認方法としては、銀染色、ウェスタンブロットング、ノザンハイブリダイゼーション、酵素活性の検出などが挙げられる。導入された遺伝子を発現する細胞は、形質転換細胞である。

【0051】還元末端アセチルグルコサミン残基にフコース残基を転移し得る酵素および異種糖タンパク質を発

現する形質転換細胞は、動物型の糖鎖を有する異種糖タンパク質を発現する。つまり、このようにして得られた形質転換植物は、動物型の糖鎖付加機能に付する。形質転換細胞を培養することにより、動物型の糖タンパク質が大量に生産される。動物型の糖タンパク質は、コア糖鎖および外部糖鎖を含み、このコア糖鎖は、少なくとも1つのマンノースおよび1つ以上のアセチルグルコサミンから本質的になる。得られる糖タンパク質の外部糖鎖は、非還元末端糖鎖部分を含む。外部糖鎖は、直鎖状構造をもついても分岐状構造をもついてもよい。分岐糖鎖部分が、モノ、バイ、トリ、またはテトラ糖鎖のいずれかであり得る。形質転換細胞により生産される糖タンパク質は、好ましくは、糖タンパク質糖鎖のN-結合型糖鎖の最もペプチド鎖に近いN-アセチルグルコサミンに α 1,6-結合するフコース残基を含む。

【0052】得られた形質転換植物細胞は、培養器官の状態で維持されてもよいし、特定の組織または器官へと分化させてもよいし、完全な植物体に再生させてもよい。あるいは、完全な植物体から得られる、種子、果実、葉、根、茎、花などの部分であってもよい。

【0053】形質転換植物細胞により生産された、動物型の糖鎖をもつ糖タンパク質は、植物細胞から単離または抽出されてもよい。糖タンパク質の単離方法は、当該分野で公知である。あるいは、本発明の糖タンパク質は、形質転換細胞中に含まれたままの状態で食用に供される。本発明の植物細胞が産生する糖タンパク質は、動物型の糖鎖を有するので、動物特にヒトに対して抗原性を有さず、それゆえ、ヒトを含む動物への投与に適している。

【0054】

【実施例】実施例で用いた材料、試薬、操作手順は、後述の一材料および方法-のセクションにまとめて記載する。

【0055】(実施例1: タバコ培養細胞への α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (以下 α 1,6-F-Tと記載する) 遺伝子の導入) タバコ培養細胞への遺伝子の導入は、植物細胞感染能を持つアグロバクテリウムを利用した、*A. tumefaciens*は、双子葉植物の形質転換に利用されている。最近では、腫瘍形成にはT1プラスミド上に存在するvir領域にコードされた遺伝子群が関与していることが明らかとなっている。植物感染に際し、アグロバクテリウムは双子葉植物の分泌するフェノール系物質を感染シグナルとして受け取るとvir遺伝子群の転写は活性化され、その結果vir遺伝子にコードされた数個のタンパク質がT-DNA遺伝子の切り出し、移行、組み込みに機能することが知られている。また、T-DNAとvir領域は、それぞれ単独では腫瘍形成能を持たないが、それぞれ別のプラスミド上にあっても同一のアグロバクテリウム中に存在すれば腫瘍形成能を示す。バイナリーベクターを用いた外来遺

伝子の導入はこの性質を利用したものである。

【0056】本実施例では、糖転移酵素ヒト由来 α 1, 6-F-T (配列番号2) のcDNA (配列番号1) (α 1, 6-F-T遺伝子がサブクローニングされたpBluescript-F-Tは大阪大学医学部、谷口直之先生より贈与された) をT-DNA領域内に挿入したバイナリベクターpGPTV-HPT-F-T、pGPTV-DHFR-F-T、pGPTV-BAR-F-Tを構築して用いた。これらのバイナリベクター構築のスキームを図1と図2に示す。

【0057】まず、pBluescript-F-Tを鋳型としてPCRにより増幅した α 1, 6-F-T遺伝子断片を制限酵素処理し、同様にPCRによって制限酵素部位を改変したpBI221ベクター (CLONTECH Laboratories, Inc.) に挿入してpBI221-F-Tベクターを作製した (図1)。プライマーの作製にあたっては Yanagidaniらの報告 (J Biochem (Tokyo) 1997 Mar; 121 (3): 626-32 Yanagidani S, Uozumi N, Ihara Y, Miyoshi E, Yamaguchi N, Taniguchi N; J Biol Chem 1996 Nov 1; 271 (44)) を参照した。

【0058】さらにpBI221-F-Tベクターから、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子、 α 1, 6-F-Tとノバリンシンターゼターミネーター遺伝子を含むXbaI-EcoRI断片を切り出し、3種の植物形質転換用バイナリベクターpGPTV-HPT (ATCC 77389としてATCC (アメリカン タイプカルチャー コレクション (アメリカ合衆国 メリーランド 20852、ロックビル、バークロー ドライブ 12301) より入手)、pGPTV-DHFR (ATCC 77390としてATCCより入手)、pGPTV-BAR (ATCC 77391としてATCCより入手) に組み込んだ (図2)。この3種のバイナリベクターのT-DNA領域にはそれぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在し、形質転換体植物細胞を取得する際、異なる薬剤において選択が可能である。

【0059】pGPTV-HPT-F-T、pGPTV-DHFR-F-T、pGPTV-BAR-F-Tと異なる薬剤耐性遺伝子を含む3種の発現用ベクターを作製したのは、形質転換細胞の選択に用いた薬剤と導入した糖転移酵素とが細胞に与える影響が未知数であるためである。どの薬剤において確実に選択がなされるのか不明であったため、予め3種の α 1, 6-F-T発現用ベクターを構築した。また今後、複数の異種遺伝子を同一のクローンに導入する際、作用機構の異なる選択マーカーをコードする発現ベクターは有利であるとの観点からも3種のベクターを構築した。

【0060】本実施例では作製したこれらの発現用ベ

クターのうち、pGPTV-HPT-F-Tを用いてタバコBY2培養細胞の形質転換を行った。

【0061】アグロバクテリウムの形質転換は、Bevan, r. the tritparental mating法 (Bevan, M., Nucleic Acid Res., 12, 8711, 1984) を用いて行った。pGPTV系プラスミド (Plant Mol Biol 1992 Dec; 20 (6): 1195-7 Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R) をもつ大腸菌Escherichia coli DH5 α 株 (suE44, Δ lacU169, (ϕ 80lacZ Δ M15), hsdR17) (Bethesda Research Laboratories Inc.: Focus 8 (2), 9 (1986))、およびヘルパープラスミドpRK2013 (Bevan, M., Nucleic Acid Res., 12, 8711, 1984) をもつ大腸菌Escherichia coli HB101を、それぞれ12.5mg/lのテトラサイクリン、50mg/lのカナマイシンを含む2 \times YT培地で37℃で1晩、アグロバクテリウムAgrobacterium tumefaciens EHA101株 (Elizabethe, E. H., J. Bacteriol., 168, 1291, 1986) を、50mg/lのカナマイシン、25mg/lのクロラムフェニコールを含む2 \times YT培地で28℃で2晩培養した。各培養液1.5mlをエッペンドルフチューブにとり集菌した後、LB培地で3回洗浄した。得られた菌体をそれぞれ100 μ lの2 \times YT培地に懸濁した後、3種類の菌を混合し、2 \times YT寒天培地に塗抹し、28℃で培養してpGPTV系プラスミドを大腸菌からアグロバクテリウムに接合伝達させた。2日後、2 \times YT寒天培地に一面に増殖した菌体の一部を白金耳でかきとり、50mg/lのカナマイシン、12.5mg/lのテトラサイクリン、25mg/lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に塗布した。28℃で2日間培養した後、単コロニーを選択した。

【0062】タバコ培養細胞の形質転換は、An, G., Plant Mol. Bio. Manual, A3, 1.に記載の方法により行った。テトラサイクリン12.5mg/lを含むLB培地で28℃で48時間培養したアグロバクテリウム (pGPTV系のプラスミドをもつEHA101株) と培養4日目のタバコ培養BY2細胞 (Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow 2 (理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター、ジーンバンク室植物細胞開発銀行のカatalog番号RPC1より細胞株名BY2として入手)) の懸濁液をそれぞれ100 μ l、4mlずつシャーレに入れてよく混ぜ、25℃に暗所で静置した。2日後シャーレの中の培養液を遠心管に移して

遠心分離(1000rpm, 5分)により上澄みを除いた。次に新しい増地を入れて遠心分離し、細胞を、20 mg/lのハイグロマイシン、250 mg/lのカルベニシリンの入った改良LS寒天増地のプレートに塗抹し、25℃暗黒下で静置した。約2～3週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。さらに2～3週間後に、ハイグロマイシン、カルベニシリンを加えた改良LS増地30mlに移し、継代培養を行った。ハイグロマイシンによる選択の結果、形質転換体カルスの取得には通常の約2倍の期間(約5週間)を要した。得られた形質転換体カルスはさらにハイグロマイシンを含む選択増地上で約1ヶ月間選抜を繰り返した。それらの耐性株の中から無作為に12株を選択し(BY2-F-T2～13株)、DNAレベルでの解析を用いた。

【0063】(BY2-F-T細胞のDNAレベルでの解析) 得られた形質転換体BY2-F-T2～13株について、それらのカルスから、後述の—材料および方法—のセクション10に記載の方法に従って、ゲノムDNAを調製しPCRによる(後述の—材料および方法—のセクション12を参照のこと)α1, 6-F-T遺伝子の組み込みを調べた。PCRには以下のプライマーを用いた。FT-Xba: 5'-TGGTTCCTGGCGTTTGATTA (配列番号3)、およびFT-Sal: 5'-GGATATGTGGGGTACTTGAC (配列番号4)。得られたPCR増殖産物を後述の—材料および方法—のセクション8に記載の方法に従って電気泳動した結果を図3に示す。

【0064】図3に示すようにBY2-F-T2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13株の11株において1700bp付近にα1, 6-F-T遺伝子領域の増幅断片と思われるバンドが確認された。一方、野生型タバコ培養細胞から調製したゲノムDNAをテンプレートとして用いた場合(図3中右端のWTで示されるレーン)、バンドは見られなかった。このことから、BY2-F-T細胞においてα1, 6-F-T遺伝子が染色体上に組み込まれていることが確認された。

【0065】(BY2-F-T細胞のRNAレベルでの解析) PCRによるゲノムDNA解析の結果、α1, 6-F-T遺伝子の導入が確認された形質転換体のうち増殖の速いBY2-F-T2, 3, 4, 6の4株について、後述の—材料および方法—のセクション11に記載の方法に従ってRNAを調製し、RT-PCRを行った(後述の—材料および方法—のセクション13を参照のこと)。結果を図4に示す。上記と同じプライマーを用いてRT-PCRを行い、得られた増殖産物を上記のDNAと同様の条件で電気泳動したところ、図4に示すように、4株とも1700bp付近にα1, 6-F-T遺伝子の増幅断片と思われるバンドが確認された。野生型BY2サンプルにおいてバンドは確認されず(図4中WTで示され

るレーン)、またCaMV 35Sプロモーター配列をもとに設計したプライマー(CaMV primer (配列番号5))とFT-Salプライマーを用いて行ったRT-PCRではバンドは見られなかった(図4、レーンA); CaMV primer: 5'-CGTCTTCAAAGCAAGTGGAT (配列番号5)。

【0066】今回、RNAサンプルの調製に用いたキットでは、回収したRNA液中にゲノムDNAのコンタミネーションも考えられたため、回収したRNAサンプルは全てDNase処理した後、RT-PCRに供した。DNase処理後のRNAサンプルを鋳型としたPCR反応ではバンドは確認されず(図4、レーンB)、これにより得られたバンドはDNAのコンタミネーションによる増幅断片ではないことが確認された。

(α1, 6-F-T酵素活性の確認) 今回、α1, 6-F-T活性測定に使用したα1, 6-F-T活性測定キットには基質糖鎖として図10の一番上に示した構造をもつ蛍光標識糖鎖が含まれている。これは東洋紡(株)においてYazawaら及びSekoらの報告(Glycoconj J 1998 Sep; 15(9): 863-71 Yazawa S, Kochibe N, Nishimura T, Shima C, Takai I, Adachi M, Asao T, Hada T, Enoki Y, Juneja LR; Biochim Biophys Acta 1997 Apr 17; 1335(1-2): 23-32 Seko A, Koketsu M, Nishizono M, Enoki Y, Ibrahim HR, Juneja LR, Kim M, Yamamoto T)を参考に卵黄から、アスパラギン残基が結合した糖鎖(Gn, Gn-bi-Asn)を調製し、アスパラギン残基に蛍光物質(4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F, 同仁化学研究所))を付加したものを(Gn, Gn-bi-Asn-NBD)である。従来、糖転移酵素の活性測定には基質糖鎖の還元末端を2-アミノニコチンで蛍光標識したPA化糖鎖が用いられるが、このPA化糖鎖は還元末端のN-アセチルグルコサミンが開環構造をとるためα1, 6-F-Tの基質糖鎖とはなり得ない。そのためα1, 6-F-Tの活性測定には様々なアクセター糖鎖と手法が模索されてきた。

【0067】今回、後述の—材料と方法—のセクションの18, 3に示した条件で反応産物のHPLC解析を行うと、未反応の基質は約9.5分に溶出し(図5の上)、また以下に示すように調製したα1, 6-Fコシロ化糖鎖標準品は約15分に溶出した(図5の下)。上記RNAレベルでの解析においてmRNAの発現が確認されたBY2-F-T2, 3, 4, 6株について、後述の—材料と方法—のセクションの14または18, 1に野生型酵素液を調製した後、α1, 6-F-T活性測定キッ

トと酵素反応させた反応液をHPLCにより分析した結果、BY2-F T3、4、6株から得られた粗酵素液の反応液において約15分に溶出するピーク成分が確認された(図6の真中および下、ならびに図7の上)。これは $\alpha 1$ 、6-フコシル化糖鎖標準品の溶出時間と一致する。

【0068】また、タバコ培養細胞を含む植物に内在する $\alpha 1$ 、3-フコシルトランスフェラーゼ($\alpha 1$ 、3-F T)について、Studacherらの報告(Glycoconj J 1995 Dec;12(6):780-6 Studacher E, Dalik T, Wawra P, Altmann F, Marz L; Glycoconj J 1998 Jan;15(1):89-91 Roitinger A, Leiter H, Studacher E, Altmann F)によるとMung bean由来の $\alpha 1$ 、3-F Tは Mn^{2+} や Zn^{2+} などの2価の陽イオン絶対要求性があり、非存在下では活性を持たない。今回使用した $\alpha 1$ 、6-F T活性測定用キットや $\alpha 1$ 、

6-F T粗酵素液中にも2価の陽イオンは添加しておらず、この点からHPLC解析において溶出時間約15分に見られるピークは、 $\alpha 1$ 、3-フコシル化糖鎖ではないことが示唆される。事実、野生型BY2サンプルのHPLCチャートにおいて、15分の位置にピークは見られなかった(図7の下)。

【0069】($\alpha 1$ 、6-フコシルトランスフェラーゼ比活性の測定)BY2-F T3、4、6株について得られた粗タンパク質抽出液の $\alpha 1$ 、6-フコシルトランスフェラーゼ比活性を測定した。比活性は、HPLCのクロマトグラムから、後述の材料と方法一のセクションの18.4に示した方法で求めた。その結果、形質転換されていないBY2株(表1中WTで示される)においては検出限界以下であったのに対し、BY2-F T6株で比活性が最も高く、6.03 U/mgタンパク質であった(表1)。ここで、1Uとは1分間あたり1pmolの基質を交換する酵素量とした。

【0070】

【表1】

BY2-F Tの粗酵素液における $\alpha 1$ -6-F Tの比活性

クローニング番号	比活性 (U/mgタンパク質)
BY2-F T3	2.57
BY2-F T4	2.53
BY2-F T6	6.03
WT	<0.03

1U: 1 pmol/分

(実施例2: $\alpha 1$ 、6-F Tのタバコ培養細胞内糖タンパク質への影響) アスパラギン結合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンに $\alpha 1$ 、6-結合したフコース残基と強く結合するエンドウ豆レクチン(PSA)を用いて、導入した $\alpha 1$ 、6-F TのBY2-F T細胞内糖タンパク質糖鎖に与える影響を調べた。まず、後述の材料および方法一のセクション14に記載に従いBY2-F T細胞より粗タンパク質抽出液を調製し、吸光度 A_{280} を測定することで粗タンパク質濃度の概略値を求めた(材料および方法一のセクション15)。これに基づき後述の材料および方法一のセクション16および17に記載に従い、SDS-PAGEを行い、そしてレクチン染色を行った。

【0071】その結果、図8に示すように、非形質転換体BY2株(図中右端のWTで示されるレーン)と比

べ、形質転換体からは細胞内糖タンパク質糖鎖にレクチンが反応したことを示す、約23 kDaの大きさの染色が見られた。このことから、BY2-F T2、3、および4株細胞において、 $\alpha 1$ 、6-フコース残基を持つ糖タンパク質が存在することが示唆された。非形質転換体BY2株細胞(WT)についても若干の染色が見られるが、これは用いたPSAが植物複合型糖鎖に存在する $\alpha 1$ 、3-フコース残基を含む他のフコース残基とも親和性を有するためであると考えられる。なお、図8中Aで示されるレーンは、ポジティブコントロールとして用いたThyroglobulinを泳動したゲルをプロットしたレーンであり、レクチンとの反応が陽性であることがわかる。

【0072】(実施例3: 形質転換タバコ培養細胞が産生する糖タンパク質の糖鎖構造の解析) 細胞増殖が最も

速いBY2-F3株を選択し、 α 1, 6-FT遺伝子導入形質転換細胞が産生する糖タンパク質の糖鎖構造を解析した。

【0073】1. BY2-F3株の産生する糖タンパク質の調製

7~10日間培養したタバコ培養細胞BY2-F3株の培養細胞(湿重量約3kg)を、ガラスホジナイザーで処理することによって破砕し細胞溶解液を得た。この細胞溶解液を、12,000rpm、20分間、4℃で遠心分離することによって糖タンパク質を含む上清を得た。この上清を、 dH_2O (脱イオン水)に対して透析した後(1.5×10⁴倍希釈)凍結乾燥して粉末サンプルを得た。

【0074】2. N結合型糖鎖の調製

次いで、この粉末サンプルを、100℃で10時間ヒドラジン分解することによって、糖タンパク質に含まれる糖鎖を切り出した。このヒドラジン分解物に、過剰のアセトンを加え、4℃、8,000rpmで20分間遠心分離することで糖鎖を沈殿させた。得られた沈殿物に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および無水酢酸を添加し、糖鎖をNアセチル化した。次いで、得られた反応物を、Dowex 50×2(室町化学工業)を用いて脱塩処理し、さらに、0.1Nアンモニア水で平衡化したTSK gel TOYO PERAL HW-40(TOSOH)ゲル濾過カラム(2.5×30cm)を通すことで、N結合型糖鎖を回収した。

【0075】3. ビリジアルミノ化(PA化)糖鎖の調製

回収したN結合型糖鎖を2アミノビリジンを用いてPA化した。PA化糖鎖は、0.1Nアンモニア水溶液で平衡化したTSK gel TOYO PERAL HW-40(TOSOH)ゲル濾過カラム(2.5×30cm)に通すことによって精製した。

【0076】4. HPLCによるPA化糖鎖の分離と解析

PA化糖鎖構造は、逆相(reversed-phase, RP)およびサイズ分画(size-exclusion, SF)HPLCの利用、エキソグリコシダーゼ消化による二次元糖鎖マッピング、そしてMALDI-TOFMS分析を行うことで解析した。

【0077】HPLC分析には、HITACHI FLD Detector L-7480を備えたHITACHI HPLC システムを用い、励起及び蛍光波長を各々310 nm、380 nmとして蛍光強度を測定した。Cosmosil 5C18-P column(6×250mm; ナカライテスク)を用いたRP-HPLC分析では、流速1.2ml/分の下で0.02% TFA水溶液中のアセトニトリル濃度を、40分間で0%から6%に増加させることでPA化糖鎖を溶出させた。また、Asahipak NH2P-50 col

umn(4.6×250mm; 昭和電工)を用いたSF-HPLC分析では、流速0.7ml/分の下で dH_2O -アセトニトリル混合液中のアセトニトリル濃度を、25分間で26%から50%に上昇させることでPA化糖鎖を溶出させた。

【0078】逆相(reversed-phase, RP)およびサイズ分画(size-exclusion, SF)HPLCの両溶出時間を比較する二次元糖鎖マッピングにより糖鎖構造を推定した。

【0079】5. エキソグリコシダーゼ消化によるPA化糖鎖の解析

Nアセチルグルコサミニダーゼ(Diplococcus pneumoniae; Roche)酵素消化反応については、各PA化糖鎖を3mMのNアセチルグルコサミニダーゼを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.45)の下で、37℃で2日間反応させた。また、 α -L-フコシダーゼ(bovine kidney; sigma)酵素反応については、10mMの α -L-フコシダーゼを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.45)の下で、37℃で2日間反応させた。各酵素消化反応は100℃で3分間煮沸することで停止させ、12,000rpmで5分間遠心した後、上清をHPLCに供した。試料糖鎖の溶出時間を既知の糖鎖の溶出時間と比較した。

【0080】6. MALDI-TOF MS分析
MALDI-TOF MS分析は、PerSeptive Biosystems Voyager DE RP Workstationを用いて行った。

【0081】7. BY2-F3株細胞由来のPA化糖鎖の構造

BY2-F3株細胞約3kgより調製したPA化糖鎖は、RP-HPLCおよびSF-HPLCを利用して精製した。RP-HPLCで分離した各フラクション(1~10)(図11のAにそのクロマトグラムを示す)を回収した後、それぞれSF-HPLCに供した。RP-HPLCで分離したフラクション1から9までのピークをさらにSF-HPLC分析すると合計55のピークが得られた(データの一部分を図11のBに示す)。これらのピークのいくつかには、複数種のPA化糖鎖が含まれていることがあったので、その場合には、再度SF-HPLCにより糖鎖を完全に精製した。

【0082】これら55のピークに相当するフラクションのうち、4D-V、5A-III、5C-III、5D-II、6B、6F-I、7Eは、フコシダーゼで切断でき、RP-HPLCにおいて分解産物の溶出時間が分解前のものと比べて前に移動した(データは示さず)。これは、これらの糖鎖に α 1, 6-フコースが結合していることを示している(GlycoconJ 1998 Jan; 15(1):89-91) HPLC method for the determin

ation of Fuc to Asn-linked GlcNAc fucosyltransferases. Roitinger A, Leiter H, Staudacher E, Altmann F.).

【0083】各糖鎖を2次元糖鎖マッピング、エキソグリコダーゼ消化、あるいはMALDI-TOF MS分析に供し、構造解析をした。その結果である糖鎖の構造を図12~14にまとめた。

【0084】フラクション4D-V、5C-III、および5D-I中のPA化糖鎖の m/z は1413. 59であり、これはM3FFX (1413. 33) に一致した。これをフコシダーゼ処理したものは、2次元マッピングでM3FXに一致し、 m/z は1267. 36であり、これもM3FX (1267. 19) に一致した。

【0085】フラクション6B、および5A-III中のPA化糖鎖の m/z は、1251. 57であり、これはM2FFX (1251. 19) (図14) と一致した。これをフコシダーゼ処理したものは、 m/z は1105. 79であり、これもM2FX (1105. 05) に一致した。

【0086】フラクション6F-I中のPA化糖鎖の m/z は1616. 14であり、これはGn¹M3FFX (1616. 52) (図14) に一致した。これをフコシダーゼ処理したものは、2次元マッピングでGn¹M3FXに一致した。また、 m/z は1471. 35であり、これもGn¹M3FX (1470. 38) に一致した。

【0087】フラクション7B中のPA化糖鎖の m/z は1459. 33であり、これはM5F (1459. 36) (図14) に一致した。これをフコシダーゼ処理すると、2次元マッピングでM5A (図12) に一致し、また m/z は1313. 43であり、これもM5A (1313. 22) に一致した。

【0088】フラクション5CIIIおよび5DII中のPA化糖鎖は、2次元マッピングにおいてM5Aに一致し、そして m/z はまた1313. 14でM5A (1313. 22) に一致した。

【0089】フラクション4F中のPA化糖鎖は、2次元マッピングにおいてM6Bに一致し、 m/z はまた1475. 82でM6B (1475. 36) に一致した。

【0090】フラクション3B中のPA化糖鎖は、2次元マッピングにおいてM7Bに一致し、 m/z はまた1638. 35でM7B (1637. 50) に一致した。

【0091】フラクション2C中のPA化糖鎖は、2次元マッピングにおいてM7Aに一致し、 m/z はまた1638. 33でM7A (1637. 50) に一致した。

【0092】フラクション2Dおよびピーク1E中のPA化糖鎖は、2次元マッピングにおいてM8Aに一致し、 m/z はまた1800. 44でM8A (1799.

64) に一致した。

【0093】また、フラクション1AIIIおよび2A中のPA化糖鎖はM3FXに、フラクション5CIII中のPA化糖鎖は、M3Xに、それぞれ2次元マッピングで一致した。フラクション7C中のPA化糖鎖をNアセチルグルコサミニダーゼ切断処理するとSF-HPLC分析でその溶出位置がGlcNAc1個分移動した。この切断断片は、2次元マッピングでM3Xに一致した。 m/z は1324. 83でGnM3X (1324. 24) に一致した。これからフラクション7C中のPA化糖鎖はGn¹M3Xと考えられる。(各糖鎖の構造については図13を参照のこと)。

【0094】フラクション5CIIおよびフラクション5DII中のPA化糖鎖をNアセチルグルコサミニダーゼ処理すると、SF-HPLC分析でその溶出位置がそれぞれGlcNAc1個分移動した。切断断片は2次元マッピングでそれぞれM3Xに一致した。 m/z は1324. 61でGnM3X (1324. 24) に一致した。これから、フラクション5CIIおよびフラクション5DII中のPA化糖鎖はGn¹M3Xと考えられる。これは、フラクション7C中のPA化糖鎖とは、RP-HPLC分析でその溶出位置が異なるので構造変異体と推測される。

【0095】フラクション4EI中のPA化糖鎖は、Nアセチルグルコサミニダーゼ切断処理すると、SF-HPLC分析でその溶出位置がGlcNAc1個分移動した。この切断断片は2次元マッピングでM3FXに一致した。 m/z は1471. 21でGnM3FX (1470. 38) に一致した。これから、フラクション4EI中のPA化糖鎖はGn¹M3FXであると推定された。

【0096】フラクション2BII中のPA化糖鎖は、Nアセチルグルコサミニダーゼ処理すると、SF-HPLC分析でその溶出位置がGlcNAc1個分移動した。これはM3FXに一致する。 m/z は1471. 29でGnM3FX (1470. 38) に一致した。従って、フラクション2BII中のPA化糖鎖はGn¹M3FXと推定された。フラクション2BII中のPA化糖鎖は、フラクション4EI中のPA化糖鎖とは、RP-HPLCにおける溶出位置が異なるので構造変異体と推測される。

【0097】フラクション3A中のPA化糖鎖は、 m/z は1674. 56でGn2M3FX (1673. 57) に一致した。Nアセチルグルコサミニダーゼ切断処理するとSF-HPLC分析でその溶出位置が2GlcNAc単位移動した。この切断断片は2次元マッピングでM3FXに一致する。これからフラクション3A中のPA化糖鎖はGn2M3FXと推定された。

【0098】その他の糖鎖は、 m/z 、 m/z 値や2次元マッピングなどのデータを考えても、該当するN-結合

型糖鎖は見られないため、N-結合型糖鎖ではないと判断された。

【0099】以上の分析の結果、N-結合型糖鎖の存在比を％で表示した。高マンノース型糖鎖が10.8％、複合型糖鎖が28.1％、 α 1, 6-フコースが結合した糖鎖が61.1％であった。 α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子で形質転換したBY2-F-T3株の細胞内糖鎖の61.1％に α 1, 6-フコースが結合していた。

【0100】上記に示したように、 α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子で形質転換したBY2-F-T3株では、細胞内糖鎖の61.1％に α 1, 6-フコースが結合していた。しかし、この α 1, 6-フコースが結合した糖鎖のほとんどに、 α 1, 3-フコースまたは β 1, 2-キシロースもまた付加されていた。 α 1, 3-フコースまたは β 1, 2-キシロースは動物に対して抗原性を示す可能性が報告されているので、これら糖鎖を、動物に対して抗原性を示す可能性をない構造にするために、 α 1, 3-フコース転移酵素、あるいは β 1, 2-キシロース転移酵素を不活性化することが必要である。これは、 α 1, 3-フコース転移酵素活性、または β 1, 2-キシロース転移酵素活性を持たない、変異体宿主植物をスクリーニングするか、作製するか、または酵素遺伝子を用いた遺伝子発現抑制を実施することで達成される。

【0101】遺伝子発現抑制は、アンチセンス法による抑制 (Wenderoth I, von Schaeuwen A. Isolation and characterization of plant N-acetylglucosaminyltransferase 1 (GnTI) cDNA sequences. Functional analyses in the Arabidopsis cgl mutant and in antisense plants. Plant Physiol. 2000 Jul; (3):1097-1108)、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを用いた部位特異的突然変異体の作成 (Beetham PR, Kipp PB, Sawczyk XI, Arntzen CJ, May GD. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligosaccharides cause in vivo gene-specific mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 Jul; 96(15): 8774-8778)、植物ウイルスを用いた遺伝子サイレンス法 (Covey SN, Al-Kaff NS. Plant DNA viruses and gene silencing. Plant Mol Biol 2000 Jun; 43(2-3): 307-322) などを用いて実施され、このような技法

は当該分野で公知である。

【0102】(実施例4: 形質転換タバコ細胞の再生による植物体の作成および植物体で産生される糖タンパク質の解析)

1. 無菌タバコ植物体の作成

1.5 ml 容量遠心チューブに、タバコ (*Nicotiana tabacum* SR1株 (日本たばこ産業株式会社葉タバコ研究所、静岡県豊田郡豊田町東原700から入手した) の種子を入れ、70％エタノールを添加し、3分間振り混ぜることによりタバコの種子を滅菌した。次いで、エタノール溶液を棄て、1 ml の滅菌水でタバコの種子を洗浄した。続いてアンチホルミン溶液 (市販の次亜塩素酸ナトリウム溶液を10倍に希釈して用いた) を1 ml 入れて、チューブを時々振り混ぜながら15分間放置した。次いで、アンチホルミン溶液を棄て、タバコの種子を滅菌水で3回洗浄した。

【0103】別に、シャーレ内でオーグベニン (明治製薬製) を最終濃度160 mg/l となるように希釈し、シャーレ内の滅菌した濾紙を浸し、この濾紙上でタバコの種子を発芽させた。発芽した種子は、MS培地に移し、明所で培養した。生育したタバコSR1株植物体の茎頂から約4 cmの部位をメスで切り、新しいMS培地に突き刺すことによって植え継ぎ、さらに明所で培養した。

【0104】2. タバコ植物体の形質転換

Anらの方 (An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. and Ha, S. B. (1988) Binary vectors. In Plant Molecular Biology Manual, A 3, 1-19, Academic Dordrecht) に従ってタバコ植物体の形質転換を行った。

【0105】要約すれば、ポットから無菌タバコの葉を切り取り、シャーレの中で1 cm角の大きさ (リーフディスク) に切り取った。別の滅菌シャーレに移し、抗生物質を含む2×YT培地で、28℃、2日間培養したアグロバクテリウム培養液 (pGPTV-HPT-F-Tを持つアグロバクテリウムEHA101株) 5 ml を入れてよく混合した後3分間静置した。このリーフディスクを取り出し、付着した余分の菌液を滅菌キムタオルで拭き取った後、MS-NB培地 (1 Lあたり Murashige-Skoog salt mixture 4.3 g, sucrose 30 g, 5% MES-KOH (pH 5.7) 10 ml, gellan gum 3 g, NAA 0.1 mg, BAP 1.0 mg, thiamin hydrochloride 10 mg, nicotinic acid 1 mg, pyridoxin hydrochloride 1 mg) 上に置かれ、25℃明所で培養した。

【0106】2日後、滅菌水の入った50 ml 容コニカルチューブにリーフディスクを移し、よく振り混ぜて洗

浄した。リーフディスクの水分を滅菌したキムタオルで拭き取った後、これを除菌培地に置き、25℃で1週間培養した。続いてリーフディスクをhygromycin B (終濃度20mg/L) およびcarbenicillin (終濃度250mg/L) を含むMS-NB培地(シュート形成培地)に移し、大きくなったカルスを適宜シュート形成培地を含むガラス製ポットに無菌的に植え替えた。約1ヶ月後に茎葉部の発達したシュートを切り取り、hygromycin B (終濃度20mg/L) およびcarbenicillin (終濃度250mg/L) を含むMS-NB培地(ルート形成培地)(但し、上記基本MS-NB培地よりBAPおよびNAAを除く)に無菌的に植え替え、ルートが出るまで、25℃明所で培養した。ポット内で大きく成長した植物体を鉢に移し、植物体を生育させ、形質転換体植物体FT(1)、FT(2)、FT1、FT2、およびFT3を得た。

【0107】3. タバコ植物体からの染色体DNAの調製

形質転換体植物体FT(1)、FT(2)、FT1、FT2、およびFT3から得られた約100mgの各植物体試料を、液体窒素中で凍結した。この凍結試料を粉砕した後、DAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使い、キットの指示書に従って、各試料から染色体DNAを調製した。

【0108】次いで、実施例1に記載のBY2-FG細胞のゲノムDNAの増幅と同様の条件でPCRを行い、 $\alpha 1$ 、6-F-T遺伝子が形質転換植物体の染色体へ組み込まれていることを確認した。プライマーとしては、CAMV primer (5'-CGTCTTCAAAAGCAAGTGGAT) とFT-Sal (5'-GGATATGTGGGGTACTTGAC) とを用いた。

【0109】得られたPCR増幅産物を、実施例1と同様に電気泳動した結果を図14に示す。図14に示されるようにFT(1)、FT(2)、FT1、FT2、およびFT3において1700bp付近に $\alpha 1$ 、6-F-T遺伝子領域の増幅断片と思われるバンドを確認することができた。その一方、野生型SR1から調製したゲノムDNAをテンプレートとして用いた場合、1700bp付近にバンドは見られなかった。このことから、形質転換

体植物体FT(1)、FT(2)、FT1、FT2、およびFT3において $\alpha 1$ 、6-F-T遺伝子が染色体上に組み込まれていることが確認された。

【0110】4. $\alpha 1$ -6-F-T形質転換体植物体で産生された糖タンパク質の解析; レクチン染色

実施例2と同様に、アスパラギン結合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンに $\alpha 1$ 、6結合したフコース残基と強く結合するエンドウ豆レクチン(P SA) (Yamamoto K, Tsuji T, Osawa T., (1982) Carbohydrate Res., 110, 283-289, Debray H., Montreuil J., (1989) Carbohydrate Res., 185, 15-26) を用いて、導入した $\alpha 1$ 、6-F-Tの形質転換体で産生された糖タンパク質を解析した。

【0111】結果を図15に示す。図15に示されるように対照であるSR1植物体と比べ、形質転換体植物体FT(1)、FT(2)、FT1、FT2、およびFT3では、糖タンパク質糖鎖にレクチンが反応したことを示す染色が見られた。このことから、形質転換体植物体において $\alpha 1$ 、6フコース残基を持つ糖タンパク質の存在が示された。

【0112】なお、SR1植物体についても若干のレクチン反応が見られるが、この弱いレクチン反応は、タバコ培養細胞を $\alpha 1$ 、6-F-T遺伝子により形質転換し、P SAレクチンにより陽性クローンを選抜した場合にも観察された。これは、用いたP SAレクチンが植物複合型糖鎖に存在する $\alpha 1$ 、3フコース残基を含む他のフコース残基とも親和性を有するためであると考えられる。

【0113】以下、上記実施例用いた材料および方法を要約する。

—材料および方法—

1. 使用植物、菌株、プラスミド

(1.1. 使用植物) 植物における形質転換体として、タバコBY2培養細胞(Nicotianatabacum L. cv. Bright Yellow 2)を用いた。

(1.2. 使用菌株) 使用菌株を表2に示す。

【0114】

【表2】

使用菌株

菌株	遺伝子型と特徴
<i>Escherichia coli</i>	
JM109	recA 1, endA 1, gyrA96, thi, hsdR 17, supR 44, relA 1, Δ(lac-proAB)/F[traD 36, proAB ⁺ , lacI ^s , lacZΔM15]
DH5α	supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
EHA101	Kanamycin ^r Carrying the trans-acting virulence functions Necessary to facilitate the transfer of the T-DNA Region of binary vectors to plant
LBA4404	Rifampicin ^r , Streptomycin ^r

- (1. 3. 使用プラスミド) 使用プラスミドを表3に示す。 【0115】
【表3】

使用プラスミド

プラスミド	遺伝子型と特徴
pUC19	Amp ^r , lacZ
pBI221	Amp ^r CaMV 35S promoter, GUS gene, and nopaline synthase terminator cloned into pUC19
pGPTV-HPT	Km ^r , Hm ^r
pGPTV-DHFR	Km ^r , Methotrexate ^r
pGPTV-BAR	Km ^r , Bialaphos ^r

2. 培地

(2. 1. バクテリア培養用培地) 2×YT培地: Bacto-tryptone 16g/l, Yeast extract 10g/l, NaCl 5g/lを用いた。平板培地には12g/lの精製寒天粉末を加えた。必要に応じて終濃度がそれぞれアンピシリン(明治製薬(株)) 50mg/l、カナマイシン(明治製薬(株)) 50mg/l、ハイグロマイシン(和光純薬)

20mg/l、クロラムフェニコール(和光純薬) 25mg/l、リファンピシン(和光純薬) 50mg/l、ストレプトマイシン(和光純薬) 20mg/l となるように加えた。

(2. 2. タバコ培養細胞用培地)

【0116】

【表4】

改変LS培地	(mg/l)		
NH_4NO_3	1650	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KNO_3	1900	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	370	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	87.3
H_3BO_3	6.2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	thiamin hydrochloride	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	nicotinic acid	1
KI	0.83	pyridoxin hydrochloride	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.26	myo-inositol	100
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	sucrose	30000
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025		

KOH で pH5.8 に調整した。

を用いた。また、ムラシゲ・スーク培地用混合塩類(和光純薬)を用いて上記の組成となるように調製したのもを用いた。

改変LS寒天培地: 改変LS培地の KH_2PO_4 を170 mg/lとし、KOHでpH5.8に調節し、さらにゲランガム(和光純薬)3 g/lを加えた。必要に応じて、終濃度がそれぞれカナマイシン150 mg/l、カルベニシリン(和光純薬)250 mg/l、ハイグロマイシン20 mg/l、メソトレキサート(和光純薬)0.1 mg/l、ビアラホス(明治製薬)10 mg/lを加えた。

【0117】3. 実験試薬、酵素

試薬は特に指定のない限り、和光純薬工業、ナカライテスクのものを用いた。制限酵素、修飾酵素は、東洋紡、宝酒造、ニッポンジーン、シグマ、NEB、のものをそれぞれの説明書に従って使用した。

【0118】4. 大腸菌の形質転換

(4.1. コンピテントセルの調製) 宿主大腸菌を2 mlの2×YT培地に接種し、その一晚培養液を坂口フラスコに入れた200 mlの2×YT培地に接種した。37℃で600 nmにおける濁度が0.6になるまで振とう培養し、遠心分離(5,000 rpm, 10分間、0℃)し、上澄み液を捨て、菌体を50 mM CaCl_2 、1.5%グリセロール混合液5 mlに懸濁した後、エッペンドルフチューブに分注し、コンピテントセルとして-80℃で保存した。

(4.2. 大腸菌の形質転換) コンピテントセルを氷中で解凍後、1~15 μlのDNA溶液を加え、水中に30分放置した。42℃に90秒間置き、直ちに水中に戻した。1 mlの2×YT培地を加えて37℃で1時間培

養し、適当な抗生物質を含む寒天培地に広げ、37℃で一晩培養した。

【0119】5. アグロバクテリウムの形質転換 Bevanらのtriparental法を用いて行った。pGPTV系プラスミドを持つ大腸菌、ヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌を37℃で一晩、アグロバクテリウムEHA101株もしくはLBA4404株を28℃で二晩、それぞれの抗生物質の入った培地で培養した。

【0120】各培養液1.5 mlをエッペンドルフチューブにとり集菌した後、2×YT培地で2回洗浄した。これらの菌体を1 mlの2×YT培地に懸濁後、3種の菌を混合して2×YT培地にまき、28℃で培養してプラスミドを大腸菌からアグロバクテリウムに接合伝達させた。2日後、2×YT培地上で一面に増殖した菌体を白金耳でかきとり、抗生物質を含む2×YT寒天培地に塗布した。28℃で2日間培養した後、単一コロニーを選択した。

【0121】6. タバコ培養細胞の形質転換

(6.1. タバコ培養細胞の継代培養) 300 mlのマイヤーフラスコに改変LS培地を95 ml入れ、温度(25~27℃)、攪拌速度(120 rpm)、暗所下で培養を行った。そして、7日毎に定常期に達した細胞を2 mlずつ植え継いだ。また、7日目に十分量の細胞数が得られない場合、植え継ぐ量を2倍の4 mlとした。

(6.2. タバコ培養細胞の形質転換) 抗生物質を含む2×YT培地中28℃で2日間培養したアグロバクテリウム培養液(pGPTV系プラスミドを持つEHA101株、LBA4404株)、100 μlと培養4日目の

タバコ培養細胞懸濁液4mlをシャーレに入れてよく混合し、25℃で暗所で静置した。2日後シャーレのなかの培養液を遠心管に移して遠心分離(1,000rpm、5分間)により上澄みを除いた。次に250mg/1のカルベニシリンを含む新しい培地を入れて遠心分離し、細胞を洗浄した。この操作を3回繰り返し、アグロバクテリウムを除いた培養細胞を20mg/1のハイグロマイシン、250mg/1のカルベニシリンを含む改良LS寒天培地にまき、25℃暗所で培養した。約2〜3週間後にカルス化した細胞を新しい改良LS寒天培地に移し、増殖しているクローンを選択した。さらに2〜3週間後に直径1cm程度に成長したカルスをハイグロマイシン、カルベニシリンを含む改良LS培地30mlに移し、継代培養を行った。

【0122】7. プラスミドDNAの少量調製
大腸菌やアグロバクテリウムからのプラスミドの少量調製はBirnboim and Dolyのアルカリ抽出法に従

った。抗生物質を含む2×YT培地で一晚培養(アグロバクテリウムは二晩)した菌体をエペンドルフチューブに移し、遠心分離(12,000rpm、5分間、室温)により集菌した。この菌体を100μlのSolution I (アグロバクテリウムの場合は5mg/1のlysozymeを含む)に懸濁し、室温に5分間放置した。次に、200μlのSolution IIを加え、よく混合し、氷中に5分間静置した。150μlのSolution IIIを加え、よく混合し、氷中に5分間静置した。遠心分離(12,000rpm、5分間、室温)後、上清を別のチューブに移し、RNase処理(37℃、30分間)を行った。フェノールクロロホルム抽出後エタノール沈殿を行い、適当量のTE bufferに溶解した。

【0123】

【表5】

TBE buffer ; 12.1g/l Tris

6.18g/l 酢酸

0.7g/l EDTA

Gel-Loading buffer ; 0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol

40%(w/v) sucrose

8. DNAの電気泳動

TBE bufferにより作成した1.0〜1.5%(w/v)アガロースを使用した。試料に1/5量のGel-Loading bufferを加え、ゲルのスロットに注入した。泳動装置はMupid-2(コスモバイオ)を用い、1×TBE buffer中、100Vの定電圧下で行った。泳動後、ゲルを0.5μg/mlのエチジウムブロマイド水溶液に20分間浸して染色した後、トランスイルミネーター上で観察した。

【0124】9. 泳動ゲルからのDNA断片の回収
Gene clean kit Ver. 2(ファコシ)を用いて行った。目的断片を含むアガロースゲルをエペンドルフチューブに移し、1/2倍量のTBE modifier、4.5倍量のNaIを加え、55℃で完全にゲルを溶かした。これに5μlのMatrixを加えてよく混合し、氷中で10分間放置した。軽く遠心分離した後、上清を捨て、200μlのWash bufferで3度沈殿を洗浄した。この沈殿を6μlのTE bufferに懸濁し、55℃で5分から10分間加熱溶出後遠心分離し、DNA溶液である上清を得た。
【0125】10. タバコからの染色体DNAの調製

(10.1. タバコ培養細胞からの染色体DNAの調製) ISOPANT (ニッポンゼン)を用いて行った。タバコ培養細胞約0.1gにSolution Iを300μl加えて攪拌し、さらにSolution IIを150μl加えてボルテックスにより攪拌して完全に混合した。50℃で15分間保温した後、Solution IIIを150μl加えて攪拌し、氷上に15分間放置した。遠心分離(12,000rpm、15分間、4℃)後、上清をとりエタノール沈殿を2度行った。沈殿を20μlのTE bufferに溶解し、1μlのRNase A(10mg/ml)で30分間処理した。(10.2. タバコカルスからの染色体DNAの調製) カルス体からの染色体DNAの調製はDNeasy Plant Mini Prep Kit (QIAGEN)を用いて行った。直径約1cmに成長したカルスを液体窒素で凍結した後、乳鉢、乳棒を用いて粉末状になるまで破砕した。この粉末(100mg)をサンプリングとしてキットの説明書に従いDNAを調製した。

【0126】11. タバコ培養細胞カルスからの全RNAの調製
カルス体からの全RNAの調製はRNeasy Min

i Prep Kit (QIAGEN)を用いて行った。操作にあたり、乳鉢、乳棒と滅菌水は0.05% dimethyl pyrocarbonate処理した後、オートクレーブ(120℃、30分間)したものを使用した。直径約1cmに成長したカルスを液体窒素で凍結した後、乳鉢、乳棒を用いて粉末状になるまで破砕し、この粉末(約100mg)をサンプルとしてキットの説明書に従いRNAを調製した。

【0127】12. PCR

(12.1. 反応系) 染色体DNA 1μl、10×PCR buffer (宝酒造 TakaraEx Ta

q付属) 5μl、dNTPs (宝酒造Takara Ex Taq付属、2.5mM) 4μl、primer (各20pmol)、Takara ExTaq (5U/μl、宝酒造) 0.5μl、滅菌水を50μlになるように加えた。

(12.2. 反応条件) 反応は以下に示す条件下で行った。サーマルサイクラーはPCR System 9700 (PE Biosystems)を用いた。

【0128】

【表6】

Stage I	サイクル数1	変性 (94℃) 5分間
		アニーリング (60℃) 2分間
		伸長 (72℃) 3分間
Stage II	サイクル数30	変性 (94℃) 1分間
		アニーリング (60℃) 2分間
		伸長 (72℃) 2分間
Stage III	サイクル数1	変性 (94℃) 1分間
		アニーリング (60℃) 2分間
		伸長 (72℃) 3分間

アニーリングの温度については、用いたプライマーのTmによって変更した。

13. RT-PCR

(13.1. 逆転写反応) RNA PCR Kit Ver. 2.1 (宝酒造)を用いて行った。Kitに付属しているMgCl₂ (5mM) 4μl、10×RNA PCR buffer 2μl、RNase Free H₂O 8.5μl、dNTPs (1mM) 2μl、RNAase Inhibitor (1U/μl) 0.5μl、Reverse Transcriptase (0.25U/μl) 1μl、OligodT-Adaptor Primer (0.125μM) 1μl、と上記11に従い調製したRNA Sample 1μlを混合し、以下のプログラムで反応を行った。サーマルサイクラーはPCR System 9700 (PE Biosystems)を用いた：サイクル数1 50℃ 30分；99℃ 5分；5℃ 5分。

(13.2. 逆転写反応後のPCR) MgCl₂ (2.5mM) 6μl、10×RNA PCR buffer 8μl、蒸留滅菌水63.5μl、TaKaRa Taq (2.5 U/100μl) 0.5μl、Primer (20pmol)を混合し、上記13.1の逆転写反応を終了したチューブに添加した。マイクロ遠心機で約10秒遠心した後、以下に示す条件で反応を行った：Stage I サイクル数1 94℃2分；Stage

II サイクル数45 94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 1.5分。

【0129】14. タバコ培養細胞からの粗タンパク質抽出液の調製

植え継ぎ7日目のタバコ培養細胞を遠心分離(3,000rpm、15分間、4℃)にて収穫した後、得られたタバコ培養細胞と同体積の50mM リン酸ナトリウム buffer (pH7.0)を加え、穏やかに転倒混合し細胞を洗浄した。この作業を3回繰り返した後、遠心分離(3,000rpm、15分間、4℃)により収穫した細胞をハンディーホモチナイザー (20ml IK EMOTO)に移し細胞を破砕した。その後、細胞破砕液を50ml遠心チューブに移し、遠心分離(12,000rpm、20分間、4℃)して粗タンパク質抽出液である上清を得た。必要に応じて、Protease inhibitor cocktail tablet (BOEHRINGER MANNHEIM)を50mlの抽出液当たり1錠加えた。さらに粗タンパク質の濃縮が必要な際には70%飽和となるように硫酸アンモニウム(和光純薬)を加え、氷上で4から5時間静置した後、遠心分離(12,000rpm、20分間、4℃)して得られたタンパク質を500μlの滅菌水に懸濁して以後の解析に用いた。

【0130】15. タンパク質の定量
DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて行った。このキットは Lowry-Folin 法に基づいている。説明書の指示に従い反応液を混合し、室温で15分間放置した。その後、750nm 吸光度を測定した。仔牛血清アルブミンを標準として 0.05~0.4mg/ml の範囲で検量線を引いてタンパク質量を求めた。

【0131】16. タンパク質の電気泳動
(16.1. トリス-グリシンドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) Laemmli の方

法に従い、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動用ゲルとしては分離ゲルに12.5%、濃縮用ゲルに2.5%のポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=30:0.8)、泳動用緩衝液としてはトリス-グリシン緩衝液を用いた。試料12μlは試料用緩衝液中で100℃で3分間加熱して変性させ、100Vの定電圧で泳動を行った。(16.2. 分子量マーカー)

【0132】

【表7】

分子量マーカーには、タンパク質分子量マーカー「第一」(第一化学薬品)

フォスフォリラーゼ	97,400
仔牛血清アルブミン	66,270
アルドラゼ	42,200
カーボニックアンヒドラーゼ	30,000
大豆トリプシンインヒビター	20,100
リゾチーム	14,000

もしくは、Prestained SDS-PAGE Standards(Bio-Rad)

フォスフォリラーゼB	106,000
仔牛血清アルブミン	80,000
オボアルブミン	49,500
カーボニックアンヒドラーゼ	32,500
大豆トリプシンインヒビター	27,500
リゾチーム	18,500

を用いた。

(16.3. タンパク質の染色) クマシーブルー染色と銀染色を行った。クマシーブルー染色は染色液(0.1% クマシーブリリアントブルーR-250、メタノール: 酢酸: 水=5:5:2 (v/v) 混液) 中にゲルを30分間浸して染色後、脱染色液(メタノール: 酢酸: 水=2:1:7 (v/v) 混液) 中で一晩振とうして脱染色を行った。銀染色は和光純薬製の銀染色キットを使い、方法はキットの説明書に従った。

【0133】17. レクチン染色
SDS-PAGE後のゲルをblotting buffer中で15分間平衡化させた後、セミドライタイプブロッキング装置(セミドライトランスファー装置BE-310バイオクラフト)を用いて、1mA/cm²の定電流で60分~70分間タンパク質を、PVDFメンブレン(Bio-Rad, Immun-Blot PVDF Membrane for Protein

Blotting, 0.2 mm) にブロッティングした。ブロッティング後、PVDFメンブレンを0.6% H₂O₂/メタノール(v/v) 溶液中に浸し、タバコ培養細胞内在性のペルオキシダーゼのブロッキングを行った。ブロッキング後、PVDFメンブレンをwashing bufferで洗浄(10分間、3回)した。次に5% Skim Milkを含むwashing buffer中にメンブレンを浸し室温で2時間穏やかに反応させた後、同様にwashing bufferでPVDFメンブレンを洗浄した。その後、ペルオキシダーゼ標識PSAレクチン(1mg/ml, EY LABORATORIES, INC.) をwashing bufferで1000倍希釈したものにPVDFメンブレンを浸し、室温で90分間反応させた。反応後、上記と同様にメンブレンを洗浄した後PODイムノステインセット(和光純薬)を用い、発色反応を行った。Wa

shing bufferの組成: 10mM Tris-HCl (pH7.4)、0.15 M NaCl、0.05% Tween20。

【0134】18. α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性測定

(18.1. 粗酵素液の調製) 培養7日目の形質転換体タバコ培養細胞を遠心分離 (3,000 rpm、20分間、4℃) によって収穫した後、上記14と同様に抽出bufferを用いて細胞を洗浄、再収穫した。その後、ハンディーホモジナイザーを用いて細胞を破砕し、遠心分離 (12,000 rpm、20分間、4℃) して得られた上清を粗酵素液とした。抽出bufferの組成: 20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.175% CHAPS。

(18.2. α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼの酵素反応) α 1, 6-活性測定に際し、操作は全て暗所で行った。東洋紡 (株) より贈与された α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性測定用基質液 (15 μ l) の入ったチューブに上記19.1で調製した粗酵素液5 μ lを混合し、37℃、3時間の酵素反応を行った。1分間の煮沸により酵素反応を停止させた後、チューブを直ちに水中に移し1分間放置した。さらにスピンドウンによって滴を落とした後、蒸留水80 μ lを加え遠心分離 (12,000 rpm、1分間、4℃) した。得られた上清のうち30 μ lをHPLC分析に供した。用いた α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性測定用基質液15 μ lあたりの内訳は、0.5 MMEs/N aOH buffer, pH7.5 8 μ l、1 nmol

1e/ μ l Gn, Gn-bi-Asn-NBD 1 μ l、5 nmole/ml GDP-Fucose (和光純薬) 2 μ l、MilliQ水4 μ lである。用いたHPLCシステム (日立社製) は、インターフェイス (L-7000)、蛍光検出器 (LaChrom L-7480)、ポンプ (LaChrom L-7100)、カラムオープン (LaChrom L-7300) から成る。

(18.3. 酵素活性の有無) HPLC分析により行った。カラムは逆相系のMightysil RP-18 GP150-4.6 (5 μ m) (関東化学4.6 \times 150 mm) を使用した。 α 1, 6-FT活性測定に用いた基質糖鎖は蛍光標識されており、蛍光検出器 (Ex: 470 nm, Em: 530 nm) によって特異的に検出することが可能である。また、 α 1, 6-フコシル化糖鎖標準品には α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性測定用基質混合物に α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (40 mU/ml、東洋紡) 5 μ lを加え、上記の1.18に従って37℃、15分間反応させたものを使用した。

(18.4. 活性測定) 以下の条件でのHPLC分析により得られる基質と反応物のピークの面積比を取り、粗酵素液タンパク質1 mg当たり1分間に転移するフコース量として活性値を求めた。粗酵素液中の総タンパク質の定量は上記の15に従って行った。

【0135】

【表8】

Buffer A : 20 mM 酢酸-アンモニウム pH4.0

Buffer B : 20 mM 酢酸-アンモニウム pH4.0-80% アセトニトリル

Buffer 比 : B=5%

モード : アイソクラティック

流速 : 1 ml/min

カラム温度 : 56℃

Ex : 470 nm

Em : 530 nm

【0136】

【発明の効果】動物型糖鎖付加機能をもつ植物細胞、該植物細胞から再生された植物体、該植物細胞を生産する方法、該植物細胞を用いて動物型糖タンパク質を生産する方法が提供される。本発明の植物細胞により産生され

る糖タンパク質は、動物型の糖鎖を有するので、動物特にヒトに対して抗原性を有さず、それゆえ、ヒトを含む動物への投与に適している。

【0137】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>: Kazuhito FUJIYAMA

<120>: Plant cell having an animal type sugar chain adding mechanism

```

<;130>; J1-00356672
<;140>;
<;141>;
<;160>; 5
<;170>; PatentIn Ver. 2.0
<;210>; 1
<;211>; 1759
<;212>; DNA
<;213>; human
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (17)..(1744)
<;400>;
aaatctctc tagaaa atg cgg cca tgg act ggt tcc tgg cgt tgg att atg 52
          Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met
                1             5             10
ctc att ctt ttt gcc tgg ggg acc ttg ctg ttt tat ata ggt ggt cac 100
Leu Ile Leu Phe Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His
          15             20             25
ttg gta cga gat aat gac cat cct gat cac tct agc cga gaa ctg tcc 148
Leu Val Arg Asp Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser
          30             35             40
aag att ctg gca aag ctt gaa cgc tta aaa cag cag aat gaa gac ttg 196
Lys Ile Leu Ala Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu
          45             50             55             60
agg cga atg gcc gaa tct ctc cgg ata cca gaa ggc cct att gat cag 244
Arg Arg Met Ala Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln
          65             70             75
ggg cca gct ata gga aga gta cgc gtt tta gaa gag cag ctt gtt aag 292
Gly Pro Ala Ile Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys
          80             85             90
gcc aaa gaa cag att gaa aat tac aag aaa cag acc aga aat ggt ctg 340
Ala Lys Glu Gln Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Arg Asn Gly Leu
          95             100             105
ggg aag gat cat gaa atc ctg agg agg agg att gaa aat gga gct aaa 388
Gly Lys Asp His Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys
          110             115             120
gag ctc tgg ttt ttc cta cag agt gaa ttg aag aaa tta aag aac tta 436
Glu Leu Trp Phe Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu
          125             130             135             140
gaa gga aat gaa ctc caa aga cat gca gat gaa ttt ctt ttg gat tta 484
Glu Gly Asn Glu Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Leu Asp Leu
          145             150             155
gga cat cat gaa agg tct ata atg acg gat cta tac tac ctc agt cag 532
Gly His His Glu Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln
          160             165             170
aca gat gga gca ggt gat tgg cgg gaa aaa gag gcc aaa gat ctg aca 580
Thr Asp Gly Ala Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr
          175             180             185
gaa ctg gtt cag cgg aga ata aca tat ctt cag aat ccc aag gac tgc 628

```

Glu	Leu	Val	Gln	Arg	Arg	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Pro	Lys	Asp	Cys	
190						195					200					
agc	aaa	gcc	aaa	aag	ctg	gtg	tgt	aat	atc	aac	aaa	ggc	tgt	ggc	tat	676
Ser	Lys	Ala	Lys	Lys	Leu	Val	Cys	Asn	Ile	Asn	Lys	Gly	Cys	Gly	Tyr	
205				210						215					220	
ggc	tgt	cag	ctc	cat	cat	gtg	gtc	tac	tgc	ttc	atg	att	gca	tat	ggc	724
Gly	Cys	Gln	Leu	His	His	Val	Val	Tyr	Cys	Phe	Met	Ile	Ala	Tyr	Gly	
				225					230					235		
acc	cag	cga	aca	ctc	atc	ttg	gaa	tct	cag	aat	tgg	cgc	tat	gct	act	772
Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Ile	Leu	Glu	Ser	Gln	Asn	Trp	Arg	Tyr	Ala	Thr	
				240				245					250			
ggt	gga	tgg	gag	act	gta	ttt	agg	cct	gta	agt	gag	aca	tgc	aca	gac	820
Gly	Gly	Trp	Glu	Thr	Val	Phe	Arg	Pro	Val	Ser	Glu	Thr	Cys	Thr	Asp	
				255				260					265			
aga	tct	ggc	atc	tcc	act	gga	cac	tgg	tca	ggt	gaa	gtg	aag	gac	aaa	868
Arg	Ser	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Trp	Ser	Gly	Glu	Val	Lys	Asp	Lys	
				270				275					280			
aat	ggt	caa	gtg	gtc	gag	ctt	ccc	att	gta	gac	agt	ctt	cat	ccc	cgt	916
Asn	Val	Gln	Val	Val	Glu	Leu	Pro	Ile	Val	Asp	Ser	Leu	His	Pro	Arg	
285					290					295					300	
cct	cca	tat	tta	ccc	tgt	gct	gta	cca	gaa	gac	ctc	gca	gat	gga	ctt	964
Pro	Pro	Tyr	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Arg	Leu	
				305					310					315		
gta	cga	gtg	cat	ggt	gac	ctc	gca	gtg	tgg	tgg	gtg	tct	cag	ttt	gtc	1012
Val	Arg	Val	His	Gly	Asp	Pro	Ala	Val	Trp	Trp	Val	Ser	Gln	Phe	Val	
				320					325					330		
aaa	tac	ttg	atc	cgc	cca	cag	cct	tgg	cta	gaa	aaa	gaa	ata	gaa	gaa	1060
Lys	Tyr	Leu	Ile	Arg	Pro	Gln	Pro	Trp	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Glu	Glu	
				335					340					345		
gcc	acc	aag	aag	ctt	ggc	ttc	aaa	aat	cca	gtt	att	gga	gtc	cat	gtc	1108
Ala	Thr	Lys	Lys	Leu	Gly	Phe	Lys	His	Pro	Val	Ile	Gly	Val	His	Val	
				350					355					360		
aga	cgc	aca	gac	aaa	gtg	gga	aca	gaa	gct	gcc	ttc	cat	ccc	att	gaa	1156
Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Val	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Phe	His	Pro	Ile	Glu	
365					370					375					380	
gag	tac	atg	gtg	cat	gtt	gaa	gaa	cat	ttt	cag	ctt	ctt	gca	cgc	aga	1204
Glu	Tyr	Met	Val	His	Val	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	
				385						390				395		
atg	caa	gtg	gac	aaa	aaa	aga	gtg	tat	ttg	gcc	aca	gat	gac	ctt	tct	1252


```

Asn Ser Leu Arg Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala
445          450          455          460
gac ttc cta gtg tgt act ttt tca tcc cag gtc tgt cga gtt gct tat 1444
Asp Phe Leu Val Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr
          465          470          475
gaa att atg caa aca cta cat cct gat gcc tct gca aac ttc cat tct 1492
Glu Ile Met Gln Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser
          480          485          490
tta gat gac atc tac tat ttt ggg ggc cag aat gcc cac aat caa att 1540
Leu Asp Asp Ile Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile
          495          500          505
gcc att tat gct cac caa ccc cga act gca gat gaa att ccc atg gaa 1588
Ala Ile Tyr Ala His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu
          510          515          520
cct gga gat atc att ggt gtg gct gga aat cat tgg gat ggc tat tct 1636
Pro Gly Asp Ile Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser
          525          530          535          540
aaa ggt gtc aac agg aaa ttg gga agg acg ggc cta tat ccc tcc tac 1684
Lys Gly Val Asn Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr
          545          550          555
aaa gtt cga gag aag ala gaa acg gtc aag tac ccc aca tat cct gag 1732
Lys Val Arg Glu Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu
          560          565          570
gct gag aaa taa agtcgactca gatgg 1759
Ala Glu Lys
          575
<:210>; 2
<:211>; 575
<:212>; PKT
<:213>; human
<:400>; 2
Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1          5          10          15
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
          20          25          30
Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
          35          40          45
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
          50          55          60
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ile
          65          70          75          80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
          85          90          95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
          100          105          110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
          115          120          125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu
          130          135          140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

```

145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
	165	170	175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
	180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys			
	195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu			
210	215	220	
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr			
225	230	235	240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
	245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile			
	260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val			
	275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Tyr Leu			
	290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His			
	305	310	315
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
	325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
	340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
	355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
370	375	380	
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu			
	405	410	415
Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile			
	420	425	430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg			
	435	440	445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val			
	450	455	460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln			
	465	470	475
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile			
	485	490	495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala			
	500	505	510
His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile			
	515	520	525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn			

```

530          535          540
Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545          550          555          560
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
          565          570          575

<;210>; 3
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: primer
<;400>; 3
tggttctgsg cgttgsgatta
<;210>; 4
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: primer
<;400>; 4
ggatatgtgsg ggtacttgac
<;210>; 5
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: primer
<;400>; 5
cgtcttcaaa gcaagtggat

```

20

20

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の植物細胞の作成に用いたベクターpBI221-F-Tの構築を示す図である。pBI221-F-Tベクター中の唯一のSacI部位をSalI部位に変換し、 $\alpha 1$ 、6-F-T遺伝子を挿入した。

【図2】本発明の植物細胞の作成に用いたベクターpGPTV-HPT-F-Tの構築を示す図である。

【図3】形質転換体BY2-F-T2～13から調製し、PCRにより増幅したゲノムDNAを電気泳動した後発色したゲルの写真である。

【図4】形質転換体BY2-F-T2、3、4および6から調製し、RT-PCRによりRNAを増幅したDNAを電気泳動した後発色したゲルの写真である。

【図5】HPLC解析の結果を示す図である。

【図6】HPLC解析の結果を示す図である。

【図7】HPLC解析の結果を示す図である。

【図8】本発明の植物細胞において生産された糖タンパク質のレクチンを用いた分析結果を示す、ゲル電気泳動ゲルからプロットした発色させたPVDfメンブレンの写真である。

【図9】植物と動物の複合型糖鎖構造を示す図である。

複合型糖鎖構造のコア部分において、植物型糖鎖にはキシロース残基が存在するのに対し、動物型糖鎖にはキシロース残基は存在しない。また、最内部のNアセチルグルコサミンに結合したフコース残基は、動物型では $\alpha 1$ 、6-結合で結合しているのに対し、植物型では $\alpha 1$ 、3-結合で結合している。

【図10】 $\alpha 1$ 、6-F-Tの活性測定に使用した基質糖鎖の構造、および活性測定系の概略を示す図である。

【図11】形質転換体BY2-F-T3培養細胞で産生された糖タンパク質のHPLC分析のクロマトグラムである。

【図12】形質転換体BY2-F-T3培養細胞で産生された糖タンパク質の糖鎖構造（高マンノース型糖鎖）の解析結果を示す図である。

【図13】形質転換体BY2-F-T3培養細胞で産生された糖タンパク質の糖鎖構造（複合型糖鎖）の解析結果を示す図である。

【図14】形質転換体BY2-F-T3培養細胞で産生された糖タンパク質の糖鎖構造（ $\alpha 1$ 、6-フコースの結合した糖鎖）の解析結果を示す図である。

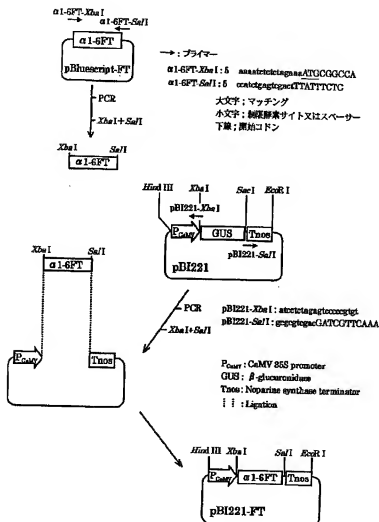
【図15】形質転換体植物体FT(1)、FT(2)、

FT1、FT2、およびFG3から調製し、PCRにより増幅したゲノムDNAを電気泳動した後発色したゲルの写真である。

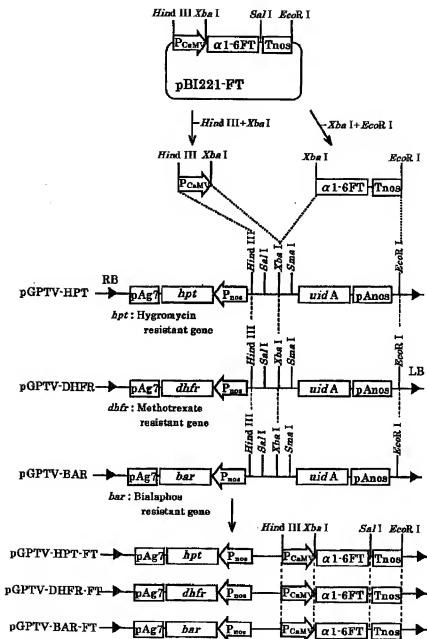
【図16】本発明の形質転換植物体において生産された

糖タンパク質のレクチンを用いた分析結果を示す、ゲル電気泳動ゲルからプロットした後発色させたPVDFメンブレンの写真である。

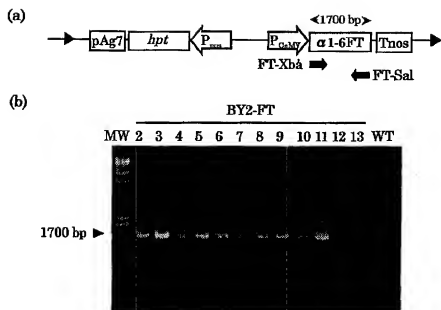
【図1】



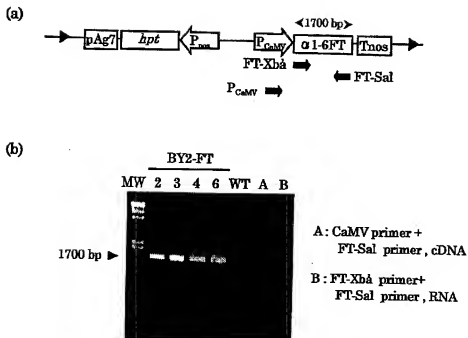
[图2]



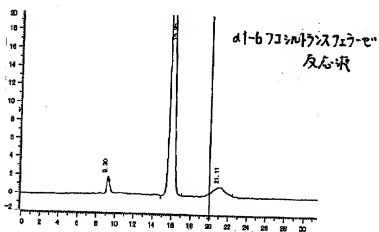
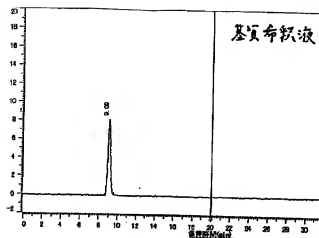
【図3】



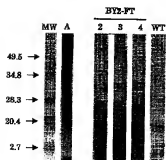
【図4】



【図5】

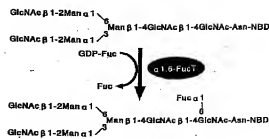


【図8】

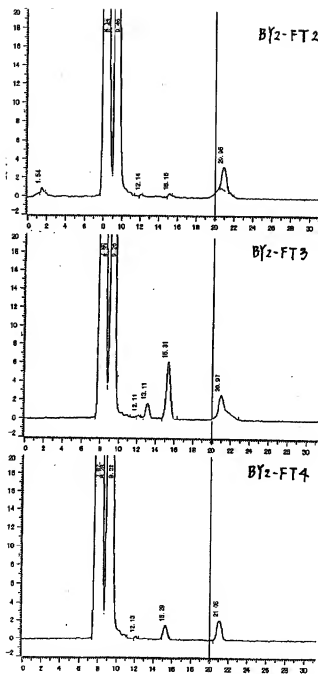


A: Thymoglobulin
WT: Wild type BY2

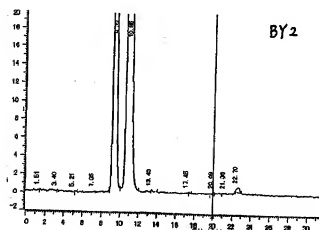
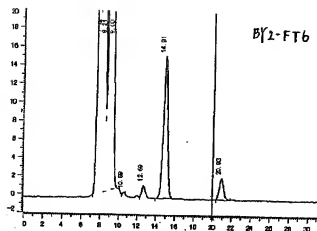
【図10】



【図6】



【図7】

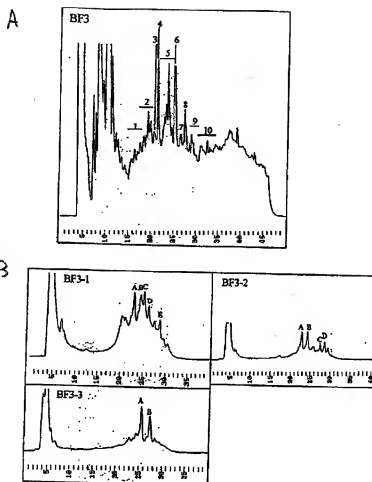


【図15】



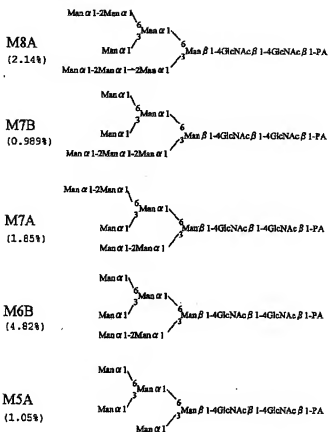
- 1.チログロブリン
- 2.分子量マーカー
- 3.FT(1)
- 4.FT(2)
- 5.FT1
- 6.FT2
- 7.FT3
- 8.野生型SR1

【図11】

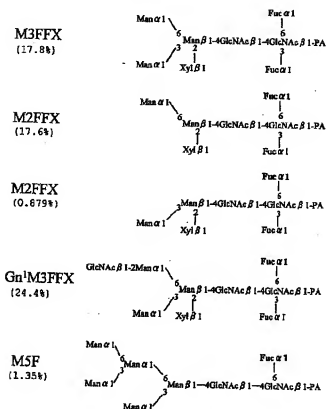


【图12】

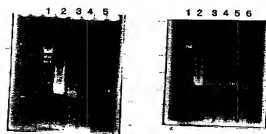
高マンノース型糖鎖



【図14】

 α 1,6フコース結合を持つ複合型糖鎖

【図16】



- 1 λ -HindIII
- 2 pGPTV-HPT-FT
- 3 FT
- 4 野生型SR1

- 1 λ -HindIII
- 2 pGPTV-HPT-FT
- 3 FT1
- 4 FT2
- 5 FT3
- 6 野生型SR1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 P 21/02

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

テ-マ-ド (参考)

C

(72)発明者 関 達治

大阪府豊中市新千里西町 2-1 1-1015
号

(72)発明者 藤山 和仁

大阪府吹田市山田西 1-28 A18-308